

**EIN SEMIAUTOMATISCHER
MIKRO-REIHENVERDÜNNUNGSTEST ZUR
BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT
ANTIMIKROBIELL WIRKSAMER SUBSTANZEN
IM KAPILLARBLUT
MIT UNTERSUCHUNGSBEISPIELEN ZUR
PHARMAKOKINETIK VON DREI ANTIBIOTIKA**

Klaus Unertl

1975

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. K. Betke

EIN SEMIAUTOMATISCHER MIKRO-REIHENVER-
DÜNNUNGSTEST ZUR BESTIMMUNG DER
AKTIVITÄT ANTIMIKROBIELL WIRKSAMER SUB-
STANZEN IM KAPILLARBLUT MIT UNTER-
SUCHUNGSBEISPIELEN ZUR PHARMAKOKINETIK
VON DREI ANTIBIOTIKA

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Klaus Unertl

aus München

München 1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Marget

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Betke

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.4.1975



I n h a l t

Seite

Einleitung	I
1. Material und Methode	2
1.1. Mikro-Reihenverdünnungstest	2
1.1.1. Laborgeräte	2
1.1.2. Testkeim	3
1.1.3. Medium	4
1.1.4. Standard	5
1.1.5. Durchführung der Untersuchungen	6
1.2. Pharmakokinetische Untersuchungen	9
1.2.1. Clindamycin	9
1.2.2. Cefazolin	10
1.2.3. Ampicillin und Pivampicillin	10
2. Ergebnisse	11
2.1. Standardaktivitäten des Teststamms Staph. aureus SG 5II	11
2.2. Clindamycin	13
2.3. Cefazolin	13
2.4. Ampicillin und Pivampicillin	14

Inhalt

Seite

3. Diskussion	14
3.1. Besprechung des Mikro-Reihenverdünnungs- tests und der Clindamycin-Untersuchungs- ergebnisse	14
3.2. Besprechung der pharmakokinetischen Ergebnisse	18
3.2.1. Cefazolin	18
3.2.2. Ampicillin und Pivampicillin	19
Zusammenfassung	22
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	24
Abbildungen und Tabellen	26
Literaturverzeichnis	34

Einleitung

In der Pädiatrie sind Untersuchungen über die Pharmakokinetik von Antibiotika (5, 10), die für eine zuverlässige antibakterielle Chemotherapie von wesentlicher Bedeutung sind (10, 12, 19), hauptsächlich an Mikrobestimmungsmethoden aus Kapillarblut gebunden, da mehrfache Venenpunktionen zu diesem Zweck nur in Sonderfällen vertretbar sind. Bestimmungsmethode der ersten Wahl war in der Vergangenheit der Mikro-Agardiffusionstest (6, 14). In diesem Labor verwendete man einen von WALTER und MARGET speziell modifizierten Mikro-Papierblättchendiffusionstest (30). Mikro-Reihenverdünnungstests gewannen zunehmend an Bedeutung, seit die teil- bzw. vollautomatische Herstellung von Mikro-Verdünnungsreihen möglich ist und die Brauchbarkeit und Zuverlässigkeit der Methode mehrfach dokumentiert wurde (9, 15, 20, 24, 26, 28). Auf dieser Basis (9, 15, 20, 27) wurde ein für pädiatrische Zwecke geeigneter Mikro-Reihenverdünnungstest (MRV) zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität im Kapillarblut entwickelt. In der vorliegenden Arbeit werden außerdem die Ergebnisse pharmakokinetischer Untersuchungen bei drei Antibiotika besprochen.

I. Material und Methode

I.1. Mikro-Reihenverdünnungstest (MRV)

I.1.1. Labogeräte.

Die vollautomatische Herstellung der Verdünnungsreihen mit dem Autotiter II (Canalco, INC, Rockville USA) umfaßte die Vorgabe von 25 µl Verdünnungsmedium durch ein Dispersionsgerät in gleichzeitig acht Vertiefungen der Autotiterplatte, Mischen und Überpipettieren der Proben durch acht 25-µl-Pipetten, sowie am Ende jedes Durchgangs das Auswaschen und Abflammen der Pipetten. Die notwendige Keimfreiheit war darüberhinaus gewährleistet durch 70-prozentiges Äthanol im Schlauchsystem des Autotiters, das nur während der Betriebsdauer des Autotiters durch das Verdünnungsmedium Standard-I-Nährbouillon (SNB) (Merck, Darmstadt, BRD) ersetzt wurde. Nach dem Auffüllen mit SNB kontrollierte man die Funktion des Dispersionsgerätes, korrigiert wurden Volumenteiler größer als 2,5 %.

Die sterilen Autotiterplatten (AP) (19 cm x 10,5 cm) enthielten 8 Reihen mit je 15 Vertiefungen (Kapazität 0,3 ml) mit "U"-Boden. Die AP wurden nach einmaligem Gebrauch verworfen.

25-µl-Tropfpipetten (Cooke, Engineering Co, Alexandria Virginia, USA) benutzte man für die Zugabe beimpfter SNB. Ein nicht berücksichtigter Volumenfehler von ca. 1 % entstand durch die von 0,9-prozentiger NaCl-Lösung (Eichflüssigkeit) abweichenden physikalischen Eigenschaften der SNB.

1.1.2. Testkeim

Für diesen Test ist jeder Bakterienstamm geeignet, der während seiner Vermehrungsphase eine messbare pH-Erniedrigung der Nährbouillon herbeiführt. Er sollte darüberhinaus keine größeren Bakterienagglomerate bilden und ausreichend empfindlich gegenüber dem zu prüfenden Antibiotikum sein. Voruntersuchungen mit unterschiedlicher Keimeinsaat und Bebrütungsdauer müssen in geeigneten Nährlösungen bei jedem Antibiotikum durchgeführt werden,

um die für optimale Trennschärfe und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse notwendigen Bedingungen zu ermitteln und um vergleichbare Resultate zu sonst üblicherweise verwendeten Makro- bzw. Mikro-Reihenverdünnungstests zu erhalten (6, 13, 26). Der Bakterienstamm *Staphylokokkus aureus* SG 511 war für die hier dargelegten Untersuchungen gut geeignet. Er wurde wöchentlich auf frische Blutagarplatten überimpft und nach 24-stündiger Bebrütung (37° C) im Kühlschrank (4° C) aufbewahrt. Die mittlere Keimeinsaat betrug 5×10^5 Bakterien/ml. Man erhielt sie aus einer 18-h-Kultur in 5 ml SNB, die zunächst 1:100 in SNB und danach nochmals 1:10 in SNB mit Glucose und Indikator verdünnt wurde.

1.1.3. Medium

Das Nährmedium der Bakterien auf der AP setzte sich zusammen aus SNB mit 1.25 % Glucose und 20 µg/ml Phenolrot als Indikator, sowie einem unterschiedlich großen Blutanteil. Ein genügender Vorrat von SNB mit 2.8 % Glucose und 44 µg/ml Phenolrot wurde in 9 ml Portionen bei 4° C aufbewahrt; sie war nach Hinzufügen von 1 ml 1:100 verdünnter Keimsuspension (s.o.) gebrauchsfertig. Die endgültige Glucose- und Indikator-

konzentration ergab sich auf der AP durch 1:2 Verdünnung. Durch den Glucosezusatz war bei ungehemmtem Wachstum des Teststamms der Indikator-Farbumschlag von rot in gelb innerhalb von 12-14 Stunden vollständig und die Ablesung des Endpunktes (= letzte Verdünnungsstufe in jeder Reihe der AP ohne Bakterienwachstum, der Indikator bleibt also rot) ohne Schwierigkeiten möglich (27).

1.1.4. Standard

Die für Testzwecke bei pharmazeutischen Firmen (Ampicillin-Na: Bayer, Leverkusen, BRD; Clindamycin-HCl: Upjohn Comp., Kalamazoo, Michigan, USA; Cefazolin: Fujisawa Pharmaceutical Co. LTD. Osaka, Japan) erhältlichen kristallinen Substanzen wurden zur Herstellung von 160 mcg/ml Stammlösungen in geeignetem Puffer benutzt und ein Vorrat bei -20° C aufbewahrt (15). Man stellte daraus 6 verschiedene Standardwertlösungen her, die zueinander in einem festen Größenverhältnis standen und deren Antibiotikumgehalt auf die zu erwartenden Blutspiegel abgestimmt war.

Für die hier zu besprechenden Untersuchungen wählte man 16 und 9.6 mcg/ml für A_1 und A_2 der AP, 8 und 4.8 mcg/ml für B_1 und B_2 der AP und 4 und 2.4 mcg/ml für C_1 und C_2 der AP (siehe Abb. 1). Man verdünnte dazu die frisch aufgetaute 160 mcg/ml-Stammlösung in SNB 1:10 (16 mcg/ml) und weiter 1:2 (8 mcg/ml) und 1:4 (4 mcg/ml). Durch Verdünnen jeder Standardwertlösung mit SNB (0.6 ml + 0.4 ml SNB) erhielt man die korrespondierenden Standardwertlösungen (9.6, 4.8 und 2.4 mcg/ml).

1.1.5. Durchführung der Untersuchungen

Pro Testwert wurden 90 μ l Kapillarblut aus Fingerbeere oder Ferse entnommen, mit 10 μ l 3.8-prozentigem Natriumcitrat versetzt und in sterilen 1.4 ml Reagenzhütchen (Sarstedt, Nümbrecht, BRD) bei 4° C bis zur endgültigen Verarbeitung aufbewahrt (maximal 6 - 8 Stunden). Dazu pipettierte man in die Standardreihen der AP (A - C) in die Vertiefungen A_1 - C_1 (siehe Abb. 1) zunächst je 25 μ l Blut ohne Antibiotikum (dem Patienten vor Verabreichung des Präparats

entnommen) und dazu je 25 μ l von den Standardwertlösungen mit 16, 8 bzw. 4 mcg/ml. In die Vertiefungen $A_2 - C_2$ pipettierte man 19 μ l Blut (ohne Antibiotikum) und 31 μ l von den Standardwertlösungen mit 9.6, 4.8 bzw. 2.4 mcg/ml. Die Vertiefungen $A_2 - C_2$ enthielten so $3/4$ der Antibiotikummenge der Vertiefungen $A_1 - C_1$. In den Testreihen (siehe Abb. 1) mischte man im gleichen Volumenverhältnis wie in den Standardreihen in $D_{1,2} - H_{1,2}$ Blut mit unbekannter antibakterieller Aktivität und einfache SNB. Von dem vor Verabreichung des Präparats entnommenen Blut, das keine antibakterielle Aktivität enthalten durfte, wurden 25 μ l zur Kontrolle in H_{13} (Abb. 1) pipettiert.

Die 1:10 Verdünnung des Blutes mit Natriumcitrat führte zu einer 10-prozentigen Verminderung des Blutspiegels. Dieser Fehler wurde später eliminiert. Man mischt jetzt das entnommene Blut in den Reagenzhütchen 1 : 1 mit den Standardwertlösungen bzw. einfacher SNB, wobei letztere das notwendige Natriumcitrat (10 %) enthalten. In die Vertiefungen $A_1 - H_1$ der AP pipettiert man je 50 μ l und in $A_2 - H_2$ je 38 μ l aus dem zur jeweiligen Reihe gehörenden Reagenzhütchen, in $A_2 - H_2$

außerdem je 12 μ l SNB.

Mit dem Autotiter II wurden die Ausgangswerte aus

$A_1 - H_1$ in den ungeraden Vertiefungen, aus $A_2 - H_2$

in jenen mit gerader Ziffer, 1 : 2 in SNB verdünnt.

Der Verdünnungsfaktor betrug damit, von 1 - 15 fort-

laufend, 1 : 1,33 und 1 : 1,5 im Wechsel. Anschließend

überprüfte man visuell die Pipettiergenauigkeit durch

Größenvergleich der aus den sedimentierten Erythrozyten

entstandenen Scheibchen; sie mußten in den senkrechten

Reihen (= gleiche Verdünnungsstufe) gleiche Größe

haben (siehe Abb. 1). Nach dem Eintropfen von je

25 μ l der beimpften SNB mit Glucose- und Indikatorzu-

satz wurde die AP mit steriler Alufolie abgedeckt und

14 - 16 Stunden in einer feuchten Kammer bei 37° C

inkubiert. Die unbekannten Aktivitäten ermittelte man durch

Vergleich mit der Standardaktivität. Berechnungsbeispiel

sei die Autotiterplatte in Abb. 1, in der die dunkelgraue

Tönung roter Indikatorfarbe, die hellgraue Tönung gelber

Indikatorfarbe entspricht. Die Endpunkte sind in den

Standardreihen in A_{13} , B_{11} und C_9 ; dies entspricht

einer Aktivität von 0,062 mcg/ml in jeder der 3 Reihen

(Standardaktivität). In den Testreihen sind die Endpunkte

in D₅, E₇, F₈, G₈, H₂, für die nun ebenfalls eine Aktivität von 0.062 mcg/ml angenommen wird. Die Rückrechnung auf die Ausgangswerte in jeder Reihe ergibt für D 0.25, E 0.5, F 0.75, G 0.75 und H 0.09 mcg/ml. Diese Werte müssen mit 4 multipliziert werden, um die ursprüngliche Aktivität/ml Blut zu erhalten.

1.2. Pharmakokinetische Untersuchungen

1.2.1. Clindamycin

Handelspräparat: Sobelin (Upjohn).

Bei 8 Kindern (Alter 3 - 14 Monate) wurden nach oraler Verabreichung von 30 mg/kg Körpergewicht (KG) Clindamycin-Base als Clindamycin-2-palmitat-hydrochlorid die Blutspiegel sowohl mit dem MRV als auch dem Mikro-Papierblättchendiffusionstest (MPD) bestimmt. Die Kinder waren nüchtern und erhielten 1.5 Stunden nach Gabe des Präparats eine altersentsprechende Kost.

*) Bei allen Kindern wurden die Chemotherapeutika entweder therapeutisch oder prophylaktisch indiziert angewandt.

1.2.2. Cefazolin

Handelspräparat: Gramaxin (Boehringer Mannheim).

Dieses neue, halbsynthetische Cephalosporin-C-Derivat wurde auf seine pharmakokinetischen Eigenschaften bei je 2 Neugeborenen und Säuglingen sowie 4 Kleinkindern mit dem MRV nach einer Einzeldosis von 25 mg/kg KG i.m. untersucht.

1.2.3. Ampicillin und Pivampicillin

Handelspräparate: Ampicillin: Amblosin (Hoechst), Binotal (Bayer), Deripen (Schering), Pen-Bristol (Grünenthal), Penbrock (Beecham), Pivampicillin: Berocillin (Boehringer Ingelheim), Maxifen (Sharp & Dohme / Boehringer Mannheim).

Pivampicillin-hydrochlorid ist eine Ampicillin-Ester Verbindung ohne nennenswerte antibakterielle Aktivität (1, 2). Sie wird jedoch gut resorbiert und zerfällt durch Hydrolyse nahezu quantitativ in freies Ampicillin (70 %), dessen Aktivität im Blut gemessen wird, sowie in Pivalinsäure (20 %) und Formaldehyd (6 %) (1).

Die pharmakokinetischen Eigenschaften dieses Präparats wurden sowohl mit herkömmlichem Ampicillin-trihydrat (Bayer), das oral verabreicht wurde, als auch Ampicillin-Na (Bayer) für intramuskuläre Injektion, verglichen. Jeweils 5 Kinder aus 3 Altersklassen (Neugeborene, Säuglinge im II. und IV. Trimenon) erhielten in einer ersten Kreuzuntersuchung Pivampicillin oral und Ampicillin-Na. i.m., in einer zweiten Kreuzuntersuchung wurde 3 x 5 Kindern aus den gleichen Altersklassen Pivampicillin und Ampicillin-trihydrat oral verabreicht. Die Einzeldosis betrug 20 mg/kg KG Ampicillin. Die Kinder waren nüchtern; sie erhielten 1,5 Stunden nach Verabreichung des Präparats eine altersentsprechende Kost. Eine weitere Kreuzuntersuchung bei 4 Säuglingen sollte darüber Aufschluß geben, wie die Verabreichung von Pivampicillin während einer Mahlzeit den Blutspiegel beeinflusst.

2. Ergebnisse

2.1. Standardaktivitäten des Teststamms Staph. aureus SG 5II

Einen Überblick über die Reproduzierbarkeit und Schwankungsbreite der im Verlauf pharmakokinetischer Untersuchungen (1-6 Monate) gemessenen Clindamycin- und Ampicillin-Standardaktivitäten gibt Tabelle 1.

Man sieht, daß in den Bereich ± 1 Verdünnungsschritt vom mittleren Wert 97,5 - 100 % und auf den mittleren Wert 53 - 84 % aller Standardaktivitäten fallen.

Tabelle 2 zeigt den Übereinstimmungsgrad zwischen je 3 Clindamycin- und Ampicillin-Standardaktivitäten pro AP. Die in mindestens 2 Standardreihen übereinstimmenden Aktivitäten (92 - 100 %) bildeten den Vergleichsstandard für die Testreihen; nur in den Fällen, in denen die Standardaktivitäten nicht in mindestens 2 Reihen übereinstimmten (8 % beim Ampicillin), mußte der Mittelwert aus den 3 Standardaktivitäten als Vergleichsstandard herangezogen werden. Berechnet man aus den Zahlen der Tabelle 2 die Wahrscheinlichkeit, mit der man den Vergleichsstandard wie oben definiert bekommt, wenn man statt 3 Standardreihen nur eine Standardreihe hat, so erhält man für das Ampicillin 81,8 % und für das Clindamycin 92,1 %.

2.2. Clindamycin

Die Mittelwerte aus 8 Einzeluntersuchungen stimmen zwischen beiden Mikromethoden gut überein, ebenso die Mehrzahl der Einzelwerte (Tabelle 3). Die Spitzenkonzentrationen von im Mittel 3,7 bzw. 4.0 mcg/ml wurden 1,5 Stunden nach Verabreichung des Präparats erreicht. Nach 8 Stunden war im allgemeinen noch antibakterielle Aktivität nachweisbar. Der Streubereich zwischen Minimum- und Maximum-Blutspiegel (Kind 1 - Kind 8) ist groß (4).

2.3. Cefazolin

Wie sich aus der nach Altersgruppen getrennten Darstellung (Abb. 2) ergibt, sind die Spitzenkonzentrationen am höchsten bei Kleinkindern (48 - 96 mcg/ml); bei Säuglingen im II. Trimenon waren sie 40 bzw. 72 mcg/ml, bei den Neugeborenen 24 bzw. 32 mcg/ml.

2.4. Ampicillin und Pivampicillin

Zwischen den verschiedenen Altersgruppen bestehen für jede Applikationsform mit Ausnahme der deutlich verzögerten Elimination der Substanz in der Neugeborenenperiode keine bemerkenswerten pharmakokinetischen Unterschiede. Die mit Abstand höchsten Blutkonzentrationen (20,8 - 25,6 mcg/ml) wurden durch i.m. Applikation erreicht. Nach oraler Gabe sind die Ampicillin-Spitzenwerte mit Pivampicillin (7,2 - 8,2 mcg/ml) um fast das 3-fache höher als mit Ampicillin-trihydrat (2,4 - 3,4 mcg/ml). Die Verabfolgung von Pivampicillin während einer Mahlzeit führt bei 4 Säuglingen im Mittel zu einem 25 % niedrigeren Spitzenwert als die Nüchternapplikation (Abb. 3).

3. Diskussion

3.1. Besprechung des MRV

Die Überlegenheit des MRV gegenüber konventionellen Röhrenverdünnungstests ist heute unbestritten. Ver-

gleichsuntersuchungen zeigten, daß der Arbeitsaufwand wesentlich geringer ist, die Ergebnisse gut reproduzierbar sind und mit den Ergebnissen konventioneller Röhrchen-verdünnungstests übereinstimmen (9, 15, 20).

Im Vergleich zum Agardiffusionstest hat der automatische Mikro-Reihenverdünnungstest grundsätzliche, von der Methodik bestimmte, Vor- und Nachteile (6, 14). Als nachteilig wird am Verdünnungstest empfunden, daß die Resultate an die Verdünnungsstufen ohne die Möglichkeit der Interpolation gebunden sind. Grenzwerte zwischen zwei Verdünnungsstufen können sowohl der einen als auch der anderen Verdünnungsstufe zufallen; aus diesen und anderen Gründen wird eine Schwankungsbreite von ± 1 Verdünnungsschritt vom mittleren Wert toleriert (14, 15, 20, 26). Ein Vorteil des Verdünnungstests ist die größere Empfindlichkeit (14), d.h. bei kleinen Testmengen lassen sich eindeutige Ergebnisse auch dann noch erzielen, wenn im Diffusionstest keine verwertbaren Hemmhöfe mehr entstehen. Durch kleine Verdünnungsschritte und 3-fach Standardbestimmung versuchte man in diesem MRV die Nachteile des Verdünnungstests auszugleichen. Im Vergleich zum üblicherweise verwendeten 1:2 Makro- oder Mikro-Ver-

dünnungstest sollte die feinere Meßskala eine genauere Bestimmung der Ergebnisse ermöglichen. Aus Tabelle 1 geht hervor, daß die kleineren Verdünnungsschritte, verglichen mit dem 1:2 Verdünnungstest, zu einer entsprechend geringeren Schwankungsbreite der Ergebnisse führten, die Resultate also genauer sind.

Aus Tabelle 2 läßt sich entnehmen, daß durch 3-fach Standardbestimmung darüberhinaus eine exaktere Festlegung des Vergleichsstandards gelang, als dies durch einfache Standardbestimmung möglich gewesen wäre.

Mit steigender Zahl von Verdünnungsschritten verringert sich auf der AP der relative Volumenanteil des Blutes entsprechend dem Verdünnungsfaktor. Wechselnde Pufferkapazität des Mediums und wechselnde Serumbindung des Antibiotikums können so zu unterschiedlichen Wachstumsbedingungen für die Testbakterien führen und damit möglicherweise die Ergebnisse verfälschen (14). In diesem MRV ist der Anteil der SNB am Gesamtvolumen bereits in Reihe I 75 %. Eine gesonderte Untersuchung mit verschiedenen Blut/SNB Volumenanteilen (0/100, 10/90, 20/80, 40/60, 60/40) zeigte,

daß ab einem SNB-Anteil von 80 % keine Fehler im o.a. Sinn zu befürchten waren. Mit dem MRV und MPD wurden bei parallelen Clindamycin-Aktivitätsbestimmungen gut übereinstimmende Resultate erzielt (Tabelle 3). Die durchschnittlich 10 % niedrigeren Werte, die mit dem MRV erzielt wurden, können auf die 10-prozentige Verdünnung des Blutes mit Natrium-Citrat zurückgeführt werden. Zur Vermeidung dieses Fehlers wurde der Untersuchungsablauf geändert (s.o.). Der Zeitbedarf für die Durchführung der Untersuchungen war für beide Methoden gleich. Beim MPD muß man jedoch wegen seiner geringeren Empfindlichkeit bei verschiedenen Antibiotika zusätzliche Maßnahmen ergreifen, wie Vorbeschicken der Blättchen mit Antibiotikum und Vordiffusion, damit ausreichend große Hemmhöfe entstehen (30).

Der beschriebene MRV wird seit über 2 Jahren in diesem Labor verwendet. Er hat sich als einfache und zuverlässige Methode zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität im Blut bewährt und den bisher verwendeten MPD weitgehend abgelöst.

3.2. Besprechung der pharmakokinetischen Ergebnisse.

3.2.1. Cefazolin

Diese vergleichende Untersuchung (Abb. 2) wurde aus einem Spektrum von Cefazolin-Untersuchungen (18) ausgewählt. Sie zeigt bei den Neugeborenen relativ niedrige Spitzenkonzentrationen und eine verzögerte Elimination, die möglicherweise auf ein größeres Verteilungsvolumen der Substanz und eine verminderte, wohl überwiegend renal bedingte Elimination, zurückzuführen sind. Dafür spricht auch die Pharmakokinetik bei Kleinkindern, die der von Erwachsenen ähnlich ist (22,29), während die Säuglinge zwischen den beiden erstgenannten Gruppen liegen. Die neue Substanz hat im Vergleich zu den übrigen Cephalosporinen eine deutlich längere Halbwertszeit (29), so daß die Dosierungsintervalle entsprechend verlängert werden können.

3.2.2. Ampicillin und Pivampicillin

Die Ergebnisse in Tabelle 4 zeigen, daß i.m. Applikation bei Neugeborenen und Säuglingen zu den weitestgehendsten Blutspiegeln führt. Nach Verabfolgung von Pivampicillin glichen sich die Aktivitäten denjenigen nach i.m. Injektion erst nach etwa 1.5 h an, sie lagen nach 3 und 6 Stunden sowohl darüber als auch darunter. Die Aktivitäten von Ampicillin-trihydrat betrugen bis 1.5 h nur $1/3 - 1/2$ der Pivampicillin-Aktivitäten, auch nach 3 und 6 Stunden lagen sie fast ausschließlich unter diesen. Andere Autoren kommen zu ähnlichen Ergebnissen (25). Auch die verzögerte Elimination in der Neugeborenenperiode steht in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen (23, 31).

Die geringste Streuung der Ergebnisse vom Mittelwert wurde nach i.m. Injektion beobachtet. Von den oral verabreichten Präparaten war die Streuung beim Ampicillin-trihydrat größer als beim Pivampicillin (Tabelle 4).

Untersuchungen bei Erwachsenen zeigten etwa gleich hohe Ampicillin-Serumkonzentrationen nach

Pivampicillin oral und Ampicillin-Na. i.m. (2, 7, 11).

Die Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse bei Erwachsenen und Säuglingen liegt möglicherweise in der wesentlich geringeren Ampicillin-Resorption im Säuglingsalter. So ist die Urinausscheidung von Ampicillin nach Verabfolgung von Ampicillin-trihydrat bei Säuglingen nur etwa halb so groß wie bei Kindern und Erwachsenen, bei denen zwischen 20-30 % der applizierten Dosis im Urin gefunden wurden (2, 7, 11, 13, 16, 17, 21, 25, 31). Pivampicillin führt bei Säuglingen in Übereinstimmung zu den Ergebnissen bei Erwachsenen zu Ampicillin-Spitzenkonzentrationen, die etwa 3x höher sind als beim Ampicillin-trihydrat. Die prinzipiell schlechteren Resorptionsverhältnisse machen jedoch ebenso hohe Blutkonzentrationen wie nach i.m. Injektion gleicher Dosen unmöglich.

Die Verabreichung von Pivampicillin mit einer Mahlzeit führte zu einer negativen Beeinflussung des Blutspiegels (Abb. 3). Diese Tatsache ist auch vom Ampicillin-trihydrat bekannt (7, 13). Untersuchungen bei Erwachsenen, in denen eine solche negative Beeinflussung nicht gefunden wurde (1, 7, 11), konnten nicht bestätigt werden.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß i.m. Injektion von Ampicillin bei Neugeborenen und Säuglingen die zuverlässigste Applikationsart darstellt. Bei oraler Applikation sollte Pivampicillin dem Ampicillin-trihydrat wegen der besseren Pharmakokinetik und damit größeren therapeutischen Sicherheit vorgezogen werden, obwohl Nebenwirkungen (3) in Form gastro-intestinaler Beschwerden auch nach unseren eigenen Beobachtungen etwas häufiger aufzutreten scheinen als mit herkömmlichem Ampicillin-trihydrat.

Zusammenfassung.

Mit einem semiautomatischen Mikro-Reihenverdünnungstest (MRV) wurde aus 44 µl Kapillarblut eine unbekannte antibakterielle Aktivität durch Vergleich mit der Aktivität in Standardverdünnungsreihen bestimmt. Gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, kleine Verdünnungsstufen (1 : 1,33 und 1 : 1,5 im Wechsel) sowie 3-fach Standardbestimmung machten den Test zuverlässig und führten insgesamt nur zu geringen methodisch bedingten Resultatschwankungen. Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Clindamycin parallel mit dem MRV und dem bis dahin verwendeten Mikro-Papierblättchendiffusionstest (MPD) zeigten, daß zwischen beiden Methoden hinsichtlich Arbeitsanfall und Genauigkeit keine bemerkenswerten Unterschiede bestehen, der MRV war jedoch empfindlicher. Mit dem MRV wurden darüberhinaus bei Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern pharmakokinetische Eigenschaften von zwei weiteren Antibiotika untersucht:

I. Cefazolin. Die Untersuchungsergebnisse bei je zwei Neugeborenen und Säuglingen sowie vier Kleinkindern zeigten eine verzögerte Elimination der Substanz und einen relativ niedrigen Spitzenwert bei Neugeborenen,

während die Kleinkinder eine den Erwachsenen ähnliche Pharmakokinetik hatten. Die bei Säuglingen gemessene Aktivität lag zwischen den beiden erstgenannten Gruppen.

2. Ampicillin und Pivampicillin. Vergleichsuntersuchungen bei Säuglingen zwischen Ampicillin-Na i.m., Pivampicillin oral und Ampicillin-trihydrat oral zeigten, daß die höchsten Aktivitäten nach i.m. Injektion erreicht wurden; Pivampicillin hatte gegenüber Ampicillin-trihydrat eine etwa 3-fach höhere Aktivität.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.

AP	Autotiterplatte
KG	Körpergewicht
MPD	Mikro-Papierblättchendiffusionstest
MRV	Mikro-Reihenverdünnungstest
SNB	Standard-I-Nährbouillon

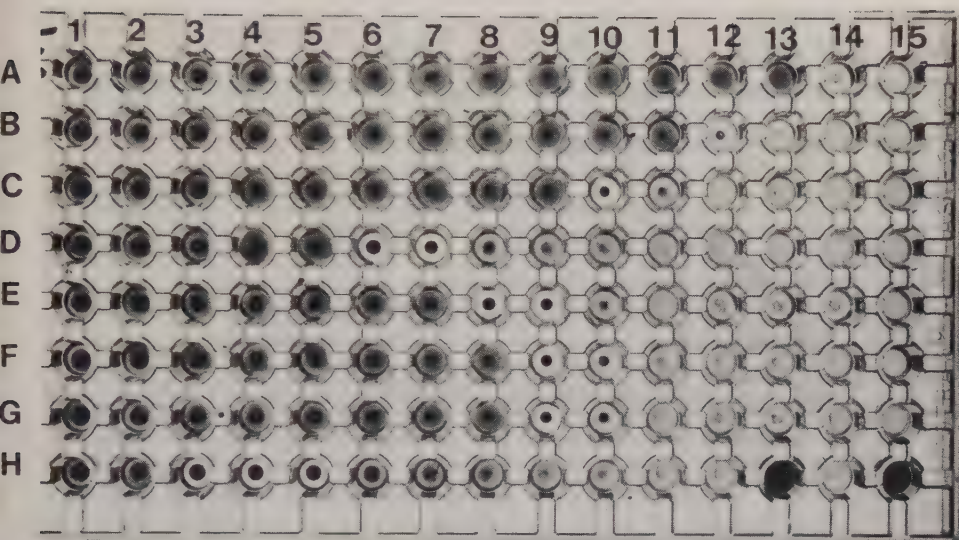


Abbildung 1. Autentiterplatte nach 16-stündiger Bebrütung bei 37° C (Teststamm *Staphylococcus aureus* SG 511). Standardreihen A-C (1-15), Testreihen D-H (1-15). Bakterienwachstum führte zum Farbumschlag des Indikators und zur Hämolyse (dunkelgrau = rote Indikatorfarbe, hellgrau = gelbe Indikatorfarbe). Schwarze Scheibchen = sedimentierte, nicht-hämolysierte Erythrozyten; die Scheibchen sind in den senkrechten Reihen gleich groß. H₁₃ und H₁₅: Das vollständig hämolysierte Blut erscheint homogen schwarz.

Tabelle 1: Standardaktivitäten (mcg/ml) des Teststamms *Staphylococcus aureus* 503 511 im Verlauf der pharmakokinetischen Untersuchungen (Dauer: 1 - 6 Monate)
bei zwei Antibiotika

Antibiotikum	Zahl der Bestimmungen	Standardaktivität (mcg/ml)					
		0,044	0,062	0,09	0,125	0,19	0,25
Ampicillin	192 (100 %)		3 (1,5%)	55 (29%)	102 (53%)	30 (15,5%)	2 (1%)
Clindamycin	51 (100 %)	1 (2%)	43 (84%)	7 (14%)			

Tabelle 2: Übereinstimmungsgrad der Standardaktivitäten in je 3 Standardreihen der Autotiterplatten (AP)

Teststamm *Staphylococcus aureus* SG 511.

Antibiotikum	Zahl der Autotiterplatten (%)	Übereinstimmung der Aktivitäten in		
		3 Reihen	2 Reihen	keiner Reihe
Ampicillin	64 (100 %)	34 (53 %)	25 (39 %)	5 (8 %)
Clindamycin	17 (100 %)	13 (76 %)	4 (24 %)	-

Tabelle 3: Clindamycin-Blutkonzentrationen bei 8 Kindern (3-14 Monate) nach oraler Applikation von Clindamycin-2-palmitat-hydrochlorid (30 mg/kg KG Clindamycin-Base). Vergleich zwischen Mikro-Reihenverdünnungstest (a) und Mikro-Papierblättchendiffusionstest (b).

Kind Nr.	Me- thode	Clindamycin-Blutkonzentrationen (mcg/ml) nach				
		1/2 h	1 h	1,5 h	4 h	8 h
1	a	4.0	6.0	8.0	8.0	8.0
	b	3.0	6.0	9.0	8.0	6.0
2	a	1.5	2.0	3.0	3.0	0.4
	b	1.0	1.5	1.8	2.0	0.9
3	a	1.5	3.0	4.0	3.0	0.0
	b	2.2	6.0	3.8	2.0	1.0
4	a	4.0	6.0	6.0	3.0	0.4
	b	5.0	6.3	5.8	3.8	1.8
5	a	3.0	4.0	3.0	1.5	0.0
	b	4.3	5.3	4.8	2.3	0.0
6	a	0.8	1.0	2.0	2.0	1.0
	b	2.0	1.0	2.8	1.0	1.0
7	a	0.0	2.0	3.0	1.5	0.5
	b	0.0	1.6	3.0	1.2	0.0
8	a	0.5	0.8	0.5	0.5	0.0
	b	1.0	1.0	1.0	0.6	0.0
Mittel- wert	a	1.9	3.1	3.7	2.8	1.3
	b	2.3	3.6	4.0	2.6	1.3

Abbildung 2: Antibakterielle Aktivität von Cefazolin
im Blut von 6 Kindern aus 3 Altersgruppen
(4 Kinder im Alter von 1-2 Jahren, 2 Säuglinge
im Alter von 4 und 6 Monaten, 2 Neugeborene).
Einzeldosis 25 mg/kg KG Cefazolin i.m.

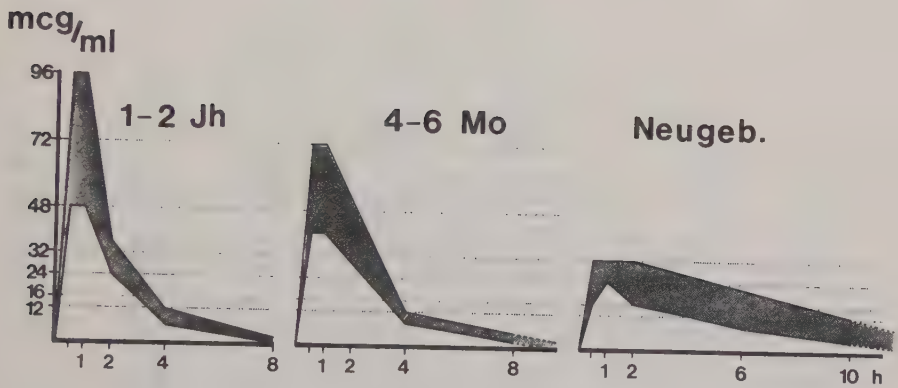


Tabelle 4: Antibakterielle Aktivität von Ampicillin im Blut von Neugeborenen und Säuglingen. Vergleichende Untersuchungen zwischen Pivampicillin oral (a) - Ampicillin-Na. i.m. (b) und Pivampicillin oral (a) - Ampicillin-trihydrat oral (c). Einzeldosis 20 mg/kg KG Ampicillin.

Altersgruppe	Kind Nr.	Methode	Aktivität von Ampicillin im Blut (mcg/ml) nach				
			1/2 h	1 h	1.5 h	3 h	6 h
Neugeborene	1	a	2.0	4.0	8.0	4.0	2.0
		b	16.0	24.0	16.0	12.0	3.0
	2	a	1.0	3.0	6.0	6.0	3.0
		b	24.0	24.0	16.0	8.0	4.0
	3	a	0.75	1.5	4.0	2.0	1.5
		b	16.0	16.0	16.0	6.0	3.0
	4	a	2.0	4.0	8.0	8.0	4.0
		b	16.0	16.0	12.0	12.0	6.0
	5	a	6.0	12.0	12.0	6.0	1.5
		b	24.0	24.0	16.0	12.0	4.0
	Mittelwert	a	2.4	4.9	7.6	5.2	2.4
		b	19.2	20.8	15.2	10.0	4.0
	6	a	2.0	3.0	3.0	2.0	1.0
		c	0.0	1.0	1.5	2.0	1.5
	7	a	3.0	6.0	4.0	3.0	1.0
		c	0.5	1.5	1.5	1.5	1.0
	8	a	6.0	12.0	16.0	12.0	3.0
		c	1.5	4.0	8.0	6.0	2.0
	9	a	2.0	4.0	6.0	4.0	1.0
		c	1.5	6.0	4.0	1.5	0.75
	10	a	16.0	16.0	12.0	4.0	1.0
		c	0.0	0.5	2.0	6.0	2.0
	Mittelwert	a	5.8	8.2	8.2	5.0	1.4
		c	0.7	2.6	3.4	3.4	1.5

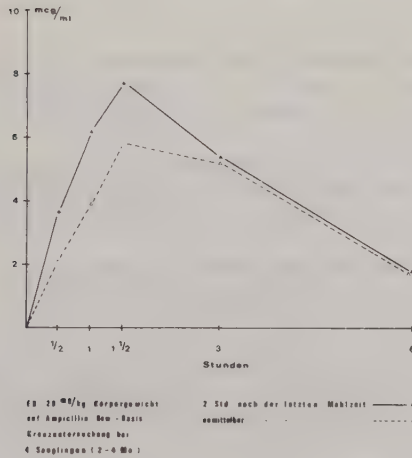
Tabelle 4: Fortsetzung.

Alters- gruppe	Kind Nr.	Me- thode	Aktivität von Ampicillin im Blut (mcg/ml) nach				
			1/2 h	1 h	1,5 h	3 h	6 h
Säug- linge (3-6 Monate)	11	a	4.0	3.0	3.0	1.5	0.5
		b	24.0	12.0	8.0	1.5	0.0
	12	a	6.0	12.0	12.0	4.0	0.75
		b	32.0	16.0	8.0	1.5	0.0
	13	a	12.0	12.0	12.0	4.0	1.0
		b	24.0	16.0	8.0	3.0	0.0
	14	a	4.0	6.0	4.0	4.0	0.75
		b	24.0	16.0	8.0	3.0	0.38
	15	a	0.75	4.0	6.0	4.0	0.0
		b	24.0	12.0	6.0	1.5	0.0
	Mittel- wert	a	5.4	7.4	7.4	3.5	0.6
		b	25.6	14.4	7.6	2.1	0.1
	16	a	2.0	8.0	8.0	2.0	0.0
		c	2.0	4.0	4.0	2.0	0.0
	17	a	4.0	8.0	8.0	4.0	1.5
		c	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0
	18	a	3.0	6.0	4.0	2.0	0.0
		c	2.0	4.0	2.0	1.5	0.0
	19	a	0.5	6.0	8.0	3.0	0.5
		c	0.0	3.0	4.0	4.0	0.75
	20	a	1.0	4.0	8.0	6.0	0.75
		c	0.0	1.0	3.0	4.0	0.75
	Mittel- wert	a	2.1	6.4	7.2	3.4	0.6
		c	0.8	2.4	2.8	2.5	0.3

Tabelle 4: Fortsetzung.

Alters- gruppe	Kind Nr.	Me- thode	Aktivität von Ampicillin im Blut (mcg/ml) nach				
			1/2 h	1 h	1.5 h	3 h	6 h
Säug- linge (9-12 Monate)	21	a	8.0	8.0	8.0	6.0	0.5
		b	24.0	16.0	12.0	3.0	0.5
	22	a	8.0	6.0	3.0	2.0	0.0
		b	24.0	24.0	16.0	4.0	1.0
	23	a	1.0	3.0	8.0	3.0	1.0
		b	24.0	16.0	12.0	3.0	0.5
	24	a	6.0	8.0	12.0	4.0	1.5
		b	24.0	12.0	6.0	2.0	0.5
	25	a	1.0	4.0	8.0	2.0	1.0
		b	24.0	12.0	6.0	1.0	0.0
	Mittel- wert	a	4.8	5.8	7.8	3.4	0.8
		b	24.0	16.0	10.4	2.6	0.5
	26	a	2.0	3.0	3.0	1.0	0.0
		c	0.0	0.0	0.75	0.75	0.0
	27	a	3.0	4.0	4.0	3.0	0.75
		c	1.0	1.5	2.0	1.5	0.0
	28	a	12.0	12.0	12.0	1.5	0.0
		c	0.0	1.5	4.0	4.0	0.75
	29	a	4.0	8.0	12.0	6.0	1.5
		c	0.0	1.5	3.0	4.0	1.5
	30	a	1.0	4.0	8.0	2.0	1.0
		c	2.0	2.0	2.0	1.0	0.0
	Mittel- wert	a	4.4	6.2	7.8	2.7	0.7
		c	0.6	1.3	2.4	2.3	0.5

Abbildung 3: Antibakterielle Aktivitäten von Ampicillin im Blut von 4 Säuglingen (2-4 Monate) nach Gabe von Pivampicillin 2 Stunden vor und während einer Mahlzeit. Einzeldosis 20 mg/kg KG Ampicillin.



BEEINFLUSSUNG DER RESORPTION VON PIVAMPICILLIN
DURCH GLEICHZEITIGE NAHRUNGS-AUFNAHME

Literaturverzeichnis:

- 1 Daehne, W. von; Fredriksen, E.; Gundersen, E.; Lund, F.; Mørch, P.; Petersen, H.J.; Roholt, K.; Tybring, L.; Godtfredsen, W.O.: Acyloxymethyl-esters of ampicillin. J. medicinal chem. 13: 607-612 (1970)
- 2 Daehne, W. von; Godtfredsen, W.O.; Roholt, K. and Tybring, L.: Pivampicillin, a new orally active ampicillin ester. Antimicrobial Agents chemother.: pp 431-437 (1970)
- 3 Danø P. and Hansen P.F.: Antibiotic treatment with pivampicillin chloride in respiratory and urinary tract infections: Chemotherapy 18: 63-71 (1973)
- 4 Daschner, F. und Marget, W.: Untersuchungen zur Anwendung von 7-Chlor-7-desoxylincomycin in der Kinderheilkunde: Arzneimittelforschung 19: 1003-1006 (1969)
- 5 Dost F.H.: Grundlagen der Pharmakokinetik (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1968)
- 6 Ericsson, H.M. and Sherris, J.C.: Antibiotic sensitivity testing: report of an international collaborative study: Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B., (Suppl. 217) 1-90 (1971)
- 7 Foltz, E.L.; West, J.W.; Breslow, L.H. and Wallick, H.: Clinical pharmacology of pivampicillin. Antimicrobial Agents chemother.: 442-453 (1970)
- 8 Geddes, A.M.; Bridgewater, F.A.J.; Williams, D.N.; Oon, J.; Grimshaw, G.J.: Clinical and bacteriological study with clindamycin. British Medical Journal 2: 703-704 (1970)

Literaturverzeichnis:

- 9 Harwick, J.H.; Weiss, P.; and Fekety, F.R.:
Application of microtitration techniques to bacteriostatic
and bactericidal antibiotic susceptibility testing.
J.Lab.clin.Med. 72: 511-516 (1968)
- 10 Heilmeyer, L. und Walter: Antibiotika-Fibel
(Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1969)
- 11 Jordan, M.C.; Maine, J.B.; Kirby W.M.M.:
Clinical pharmacology of pivampicillin as compared
with ampicillin: Antimicrobial Agents chemother.:
438-441 (1970)
- 12 Kienitz M. und Mann G.: Die Anwendung von
Antibiotika und Chemotherapeutika in der pädiatri-
schen Praxis. Deutsches Medizinisches Journal
23: 305-309 (1972)
- 13 Klein, J.O.; Finland M.: Ampicillin activity in
vitro and absorption and excretion in normal
young men. Amer.J.med.Sci. 245: 544-555 (1963)
- 14 Klein, P.: Bakteriologische Grundlagen der chemo-
therapeutischen Laboratoriumspraxis. (Springer,
Berlin-Göttingen-Heidelberg 1957)
- 15 Mac Lowry, J.D.; Jaqua, M.J.; Selepak, S.T.:
Detailed methodology and implementation of a semi-
automated serial dilution microtechnique for anti-
microbial susceptibility testing. Appl. Microbiol. 20:
46-53 (1970)
- 16 Marget, W. und Wagner M.: Orale Anwendung von
Propicillin, Ampicillin und Dicloxacillin im Säug-
lingsalter. Med.Klin.: 62: 300-305 (1967)

Literaturverzeichnis:

- 17 Marget, W.; Daschner F.; Unertl, K.: Investigations on pivampicillin treatment in newborns and infants. Infection 1: 41 (1973)
- 18 Marget, W.; Belohradsky, B.; Daschner F.: Investigations on the applikation of cefazolin in children. Infection 2 (Suppl. 1): 49-53 (1974)
- 19 Marget, W. und Kienitz, M.: Praxis der Antibiotikatherapie im Kindesalter. (Georg Thieme Verlag Stuttgart 1966)
- 20 Marymont, J.H. and Wentz, R.M.: Serial dilution antibiotic sensitivity testing with the microtiter system. Amer.J.clin.Path. 45: 548-551 (1966)
- 21 Michel, M.F.; van Waardhuizen, J.P. and Keerebijn K.F.: A comparison of serum concentrations after oral administration of azidocillin and ampicillin in children. Chemotherapy 18: 77-84 (1973)
- 22 Nishida, M.; Matsubara, T.; Murakawa, T.; Mine, Y.; Yokota, Y.; Goto S.; Kuwahara, S: Cefazolin, a new semisynthetic cephalosporin antibiotic. In vitro and in vivo antimicrobial activity. J.Antibiot. (Tokyo) 23: 137-148 (1970)
- 23 Rohwedder, H.J. und Wagner Th.: Beiträge zum Problem der Pharmakokinetik bei Kindern, dargestellt am Beispiel der renalen Elimination von Ampicillin. Mschr.Kinderheilk. 116: 126-130 (1968)

Literaturverzeichnis:

- 24 Scavizzi, M.R. et Rykner, G.: Détermination de la concentration minima inhibitrice des antibiotiques. *Nouv.méd.* 29: 1951-1952 (1972)
- 25 Simon, C.; Nehls, R.; Malerczyk, V.; Toeller, W.; Zierott, G. und Lehmann, K.: Pivampicillin, ein neues Ampicillin-Derivat. *Dtsch.med.Wschr.* 99: 137-141 (1974)
- 26 Tilton, R.C.; Liebermann, L. and Gerlach, E.H.: Microdilution antibiotic susceptibility test: examination of certain variables. *Appl.Microbiol.* 26: 658-665 (1973)
- 27 Tippelt, L.O.; Zeleznick, L.D.; Robb, C.A.: Modifikation of the microtiter technique for antimicrobial drug susceptibility testing by incorporation of indicators. *Appl. Microbiol.* 20: 342-345 (1970)
- 28 Unertl, K.; Daschner, F.D.; Marget, W.: A semiautomatic microtube dilution method for determination of antibiotic blood concentrations. *Chemotherapy* (im Druck)
- 29 Vömel, W. und Hoffmann, R.: Grundlagen für die Bewertung der chemotherapeutischen Wirkung von Cefazolin beim Menschen. *Infection* 2 (Suppl. I) 40-48 (1974).
- 30 Walter, A. und Marget, W.: Eine Mikromethode geeignet zur Bestimmung von Blutkonzentrationen der meisten gebräuchlichen Antibiotika. *Z.Hyg.InfektKr.* 145: 320-330 (1958)
- 31 Weingärtner, L.; Patsch, R.; Weigel, W.; Müller, R.: Ampicillin - ein halbsynthetisches Penicillin - in Schwangerschaft, Neu- und Frühgeborenenperiode. *Mshr.Kinderheilk.* 116: 63-71 (1968)

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Marget für die Überlassung des
Themas und für Rat und Kritik während der Planung
und Durchführung der erforderlichen Untersuchungen.

Herrn Dr. Schreiber, Institut für Biomathematik der
Universität München, für statistische Beratung.

Fräulein E. Thulin für die Durchführung der Unter-
suchungen mit dem Mikro-Papierblättchendiffusionstest.

Lebenslauf

Ich wurde am 8. September 1945 als erstes Kind des Posthauptsekretärs Andreas Unertl und seiner Frau Hedwig, geb. Stock, in Somborn, Kreis Gelnhausen, geboren.

- | | |
|-------------|--|
| 1951 - 1955 | besuchte ich die Volksschule in Aschaffenburg . |
| 1955 | trat ich in das Naturwissenschaftliche Gymnasium in Aschaffenburg ein. |
| 1961 | beendete ich mit der Oberstufenreife die Schulausbildung und begann eine Lehre bei der Deutschen-Angestellten-Krankenkasse, Aschaffenburg. |
| 1963 | legte ich vor der Industrie- und Handelskammer Aschaffenburg die Kaufmanns-gehilfenprüfung ab. Anschließend war ich als Angestellter weiterhin bei der DAK tätig. |
| 1965-1967 | leistete ich Wehrdienst.
Während dieser Zeit bereitete ich mich in Abendkursen in den Oberstufen-Förderlehrgängen der Städt. Abend-realschule München auf die Begabten-prüfung vor. |
| 1967 | legte ich vor dem Bayer. Staatsministe-rium für Unterricht und Kultus die Prüfung zur Zulassung zum Hochschul-studium ohne Reifezeugnis (Begabten-prüfung) ab. |
| WS 1967/68 | nahm ich das Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München auf. |

- WS 1968/69 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab.
- August 1969 heiratete ich Fräulein Ingeborg Posselt aus München.
- SS 1970 legte ich die ärztliche Vorprüfung und am 20.12.
- 1973 die ärztliche Prüfung ab.

Als Medizinalassistent war ich bisher tätig vom

- 1.5.74-31.8.74 im Städt. Krankenhaus Harlaching, München, I. med. Abteilung, Lt. Arzt: Prof. Dr. Bergstermann.
- 1.9.74-31.12.74 in der I. Med. Klinik der Universität München, Direktor: Prof. Dr. Schwiegk.

